

平成25年5月1日発行(毎月1回1日発行)通巻744号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

MAY
2013
Vol.68

5

緊急座談会 • Table talk

あれから2年

改めて福島原発事故を問う

真相を闇に葬らないために

研究物語 • Research story

世界ではじめての

含ホウ素 C_{60} を創出

光の限界を超える！

Mutoh Katsuya Abe Jiro
武藤 克也・阿部 二郎

—— 回折限界を破る超解像顕微鏡

Keyword

超解像顕微鏡(super resolution microscopy), フォトクロミズム(photochromism),
蛍光スイッチング(fluorescence switching), 回折限界(diffraction limit)

われわれ生物はミクロな構造体の集合であり、その構造や機能を解明するためにバイオイメージング技術が発達してきた。とくに蛍光顕微鏡はその簡便さから、今日のイメージング研究において欠かせないものとなっている。しかし、通常の蛍光顕微鏡では光の回折限界により波長の約半分程度の大きさ(200 nm)までしか観察できず、多くの細胞小器官の微細構造を観察することはできない。そこで近年ではSTED(stimulated emission depletion)顕微鏡や、PALM(photoactivated localization microscopy), STORM(stochastic optical reconstruction microscopy)など、光の回折限界を超える空間分解能を実現した超解像顕微鏡技術が確立され、数十nmの微細構造まで観察することが可能となった。本稿では、超解像顕微鏡について紹介するとともに、超解像顕微鏡プローブとして注目されているフォトクロミズムを利用した蛍光スイッチング分子について述べる。

限界を超えた超解像顕微鏡

STED顕微鏡¹⁾はRESOLFT(reversible saturable optical linear fluorescence transitions)顕微鏡の範疇に属し、光の回折限界付近まで絞り込んだ蛍光スポットに対してドーナツ状の誘導放出光を照射し、辺縁部を強制的に基底状態へ遷移させることで中心からの蛍光のみを観察し(図1a)、視野内を走査することで超解像イメージを得る。この原理を応用し、光によって蛍光能のON/OFFが可能な蛍光プローブを用いる光スイッチング顕微鏡²⁾も提唱されている。PALM³⁾, STORM⁴⁾では視野内の蛍光分子を微弱な光で数個ずつ発光させ、得られた発光スポットの中心を二次元ガウス関数でフィッティングすること

により分子の位置を決定する(図1b)。この分子を退色、あるいは再びOFF状態へとスイッチングし、また別の分子を確率的にONにする。この操作を数千から数万回繰り返すことによって全分子の位置を特定し、超解像イメージを構築する。これらの超解像顕微鏡は三次元観察やマルチカラー観察も可能であり、これまで観察できなかった細胞内の構造体を次つぎと明らかにしている。

超解像顕微鏡プローブの開発

RaymoらはT型フォトクロミック分子であるオキサジン誘導体を利用した蛍光スイッチングにより超解像イメージングを達成した⁵⁾。[1.3]オキサジンは紫外光照射によりC-O結合の開裂が起こり、*p*-ニトロフェノレートをもつインドリウムを生成する。紫外光照射を止めるとインドリウムは室温において数マイクロ秒以内にもとの[1.3]オキサジンへと熱的にもどる。この[1.3]オキサジンに蛍光色素としてクマリンを導入した化合物**1**は、[1.3]オキサジン構造(**1a**)においては波長400nmにクマリンに由来する吸収帯をもつものに対し、インドリウム(**1b**)では共役長が伸びることにより580nmにまで深色シフトする(図2a)。このような光異性化に伴う電子構造変化により、580nmの蛍光励起光を照射すると**1b**のみが蛍光を発するため、**1a**と**1b**間の異性化に伴い、蛍光のON/OFF制御が可能となる。実際に**1a**をPMMAに10⁻⁵%程度ドーブしたフィルムを作成し、紫外光照射により少数の**1a**を確率的に**1b**へと異性化させ、PALMによる光の回折限界を超えた蛍光顕微鏡観察に成功した。

また、筆者らは高速フォトクロミック分子である[2.2]パラ

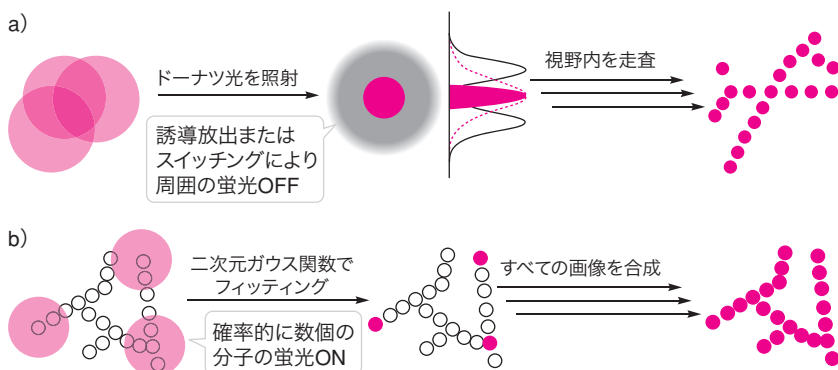


図1 超解像顕微鏡の原理

a) STED顕微鏡, b) PALM, STORMの模式図。

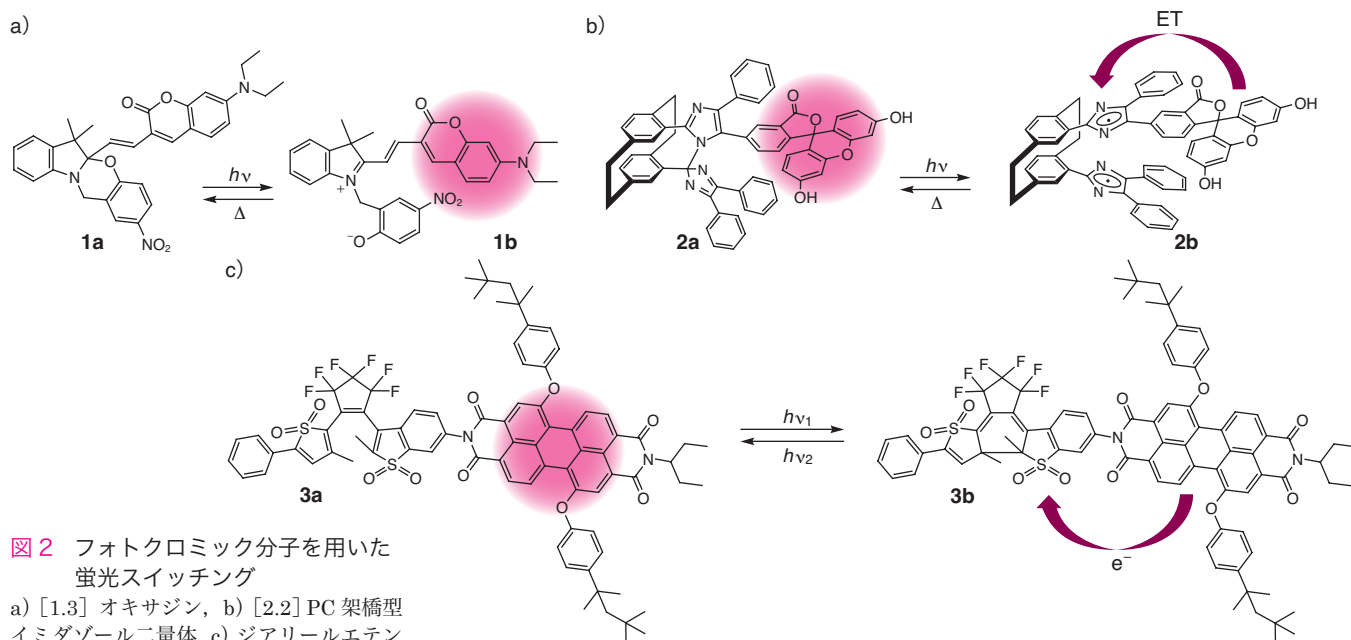


図2 フォトクロミック分子を用いた
蛍光スイッチング

a) [1.3] オキサジン, b) [2.2] PC 架橋型
イミダゾール二量体, c) ジアリアルエテン.

シクロファン ([2.2] PC) 架橋型イミダゾール二量体を用いた蛍光プローブを開発した⁶⁾. [2.2] PC 架橋型イミダゾール二量体に蛍光色素としてフルオレセインを導入した化合物 **2** は、消色体 (**2a**) への紫外光照射により発色体であるラジカル種 (**2b**) を生成し、照射を止めると数十ミリ秒以内にもとの **2a** へともどる (図 2b). **2a** では蛍光波長領域に吸収帯が存在しないが、**2b** では吸収帯をもつため、**2b** においてのみ蛍光色素からの共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こり、励起状態が熱的に失活し蛍光は消光される。また、フルオレセインが増感色素として働くことで **2a** は可視光照射により **2b** を生成するため、単一波長の光照射で蛍光の ON/OFF スイッチが可能という特徴がある。

超解像顕微鏡を応用した情報記録

STED 顕微鏡は任意の分子の蛍光能を局所的にコントロールすることが可能なため、蛍光の ON/OFF を情報とする高密度記録が期待できる。Hell らは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を遺伝子改変することで光スイッチングが可能、かつ耐久性の高い rsEGFP を開発し、STED 顕微鏡を用いて一辺 250 nm の空間内に 3×3 ビットのパターンを作成することに成功した⁷⁾。しかし、rsEGFP は読みだし光によっても光異性化して記録された情報がぼやけてしまうため、このように分子の光異性化を

利用して情報記録する場合には、読みだし光で情報が消去されない非破壊読みだしが求められている。

一方、深港、入江らは、ジアリアルエテン (DE) に蛍光色素としてペリレンビスイミド (PBI) を導入した化合物 **3** を合成し、電子移動を利用した単分子蛍光スイッチングを達成した⁸⁾。化合物 **3** は開環体 (**3a**) に可視光照射することで閉環体 (**3b**) へ、**3b** に紫外光照射することで **3a** へと異性化する P 型フォトクロミック分子である (図 2c). **3b** の LUMO は **3a** と比較して約 0.4 eV 低く、励起された PBI から **3b** へ電子移動することで PBI の励起状態が失活する。さらに、蛍光励起波長である 500 ~ 550 nm においては PBI のみが吸収帯をもつため、PBI から DE へのエネルギー移動が抑制され、かつ PBI の S_1 状態が DE の T_1 状態よりも低いことで蛍光励起光による閉環反応が抑制され、非破壊読みだしを可能にしている。これは分子の電子状態を精密にコントロールした好例である。

このように超解像顕微鏡は光の回折限界を破ることで強力なナノ構造観察手法として確立されただけでなく、ナノ領域において光で分子をコントロールするツールとしても応用可能であり、今後の発展が期待される。 【青山学院大学理工学部】

1) T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8206 (2000). 2) P. Dedecker, J.-I. Hotta, C. Flors, M. Sliwa, H. Uji-i, M. B. J. Roeffaers, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 16132 (2007). 3) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science*, **313**, 1642 (2006). 4) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods*, **3**, 793 (2006). 5) E. Deniz, M. Tomasulo, J. Cusido, I. Yildiz, M. Petriella, M. L. Bossi, S. Sortino, F. M. Raymo, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 6058 (2012). 6) K. Mutoh, M. Sliwa, J. Abe, *ibid.*, **117**, 4808 (2013). 7) T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nature*, **478**, 204 (2011). 8) T. Fukaminato, T. Doi, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4984 (2011).